

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520141153591

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

鞘内注射青藤碱对神经病理性疼痛大鼠的
镇痛作用和机制研究

Study on the analgesic effect and mechanism of intrathecal
administration sinomenine on neuropathic pain rats

王 杉

指导教师姓名: 文磊 教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2017 年 5 月

论文答辩日期: 2017 年 5 月

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 本实验采用大鼠部分脊神经结扎神经病理性疼痛模型, 通过鞘内置管中枢给药的方法, 观察青藤碱对神经病理性疼痛大鼠热刺激、机械刺激等疼痛行为学变化, 探讨和比较青藤碱的镇痛作用。并且通过分子生物学等方法, 研究青藤碱镇痛作用的相关机制。

方法: 通过大鼠颈部枕骨大孔进行鞘内置管, 将一根长约 8cm 的 PE-10 导管置于大鼠腰骶膨大处。置管后大鼠适应 5 天后进行部分脊神经结扎手术。术后观察大鼠一般情况和体重变化。术后第 7d 单次鞘内注射不同浓度青藤碱, 观察大鼠 6h 内急性疼痛行为学的变化, 术后第 8d 至 15d, 连续鞘内注射不同浓度青藤碱, 观察大鼠的慢性疼痛行为学变化, 术后第 15d 给药后处死大鼠, 取脊髓背角, 运用分子生物学方法检测青藤碱对大鼠疼痛相关蛋白表达的影响。

结果: 大鼠鞘内置管前后对疼痛行为学无显著差异性 ($P>0.05$)。大鼠 SNL 手术后出现缩脚、舔足等行为变化, 但不影响其自主活动。急性鞘内注射不同浓度青藤碱后, 大鼠机械缩足阈值和热刺痛应激潜伏期显著增加, 在给药后 2h 达到高峰 ($P<0.05$), 呈现剂量依赖性; 连续鞘内注射青藤碱能够持续性缓解大鼠疼痛症状, 呈现剂量依赖性, 且未发现大鼠对青藤碱产生耐受性。分子生物学实验结果显示, 大鼠 SNL 术后谷氨酸受体 NR1、NR2A, 谷氨酸转运体 GLT-1、GLAST, 突触相关蛋白 synapsin、synaptophysin、syntaxin 和 PSD-95 表达的升高, 以及 Calpain、CDK5 及其激活蛋白 p35/p25 等表达的增加。给予不同剂量青藤碱和吗啡治疗后, 上述各种蛋白均有不同程度的降低。

结论: 在神经病理性疼痛模型中, 鞘内注射青藤碱具有显著的镇痛作用, 呈现出剂量依赖性, 且连续给药不会产生耐药性。青藤碱可能通过调节 CDK5 激酶影响谷氨酸受体及相关突触蛋白的表达, 进而发挥中枢镇痛效应。

关键词: 青藤碱; 神经病理性疼痛; 脊髓背角; 谷氨酸受体; 细胞周期蛋白依赖性激酶 5

Abstract

Objective: On this study, we use the spinal nerve ligation model to simulate the neuropathic pain to observe the change of mechanical withdraw threshold and thermal withdraw legacy and compare the analgesic effect by intrathecal administration of sinomenine. We also explore the analgesic mechanism of sinomenine by molecular biochemical methods.

Methods: A 8cm PE-10 catheter was placed in the lumbosacral dilatation of rats by intrathecal catheterization in the posterior occiput of the rat. The rats were treated with spinal nerve ligation in 5 days after intrahecal administration. The general behavioral changes and body weight were observed after SNL. At the 7th day after SNL, various does of sinomenine were injected intrathecally to observe the changes of acute pain behavior in rats within 6 hours. At 8 days to 15 days after SNL, rats were injected intrathecally with various does of sinomenine to observe the changes of chronic pain behavior in rats. The rats were sacrificed and taken spinal dorsal horn out on the 15th day after SNL to detect the expression of pain-related protein by molecular biology methods.

Results: There was no significant difference in pain behavior between the two groups before and after intrathecal administration ($P>0.05$). Rats appers paw withdrawal, licking feet and other pain behavior changes after SNL, which does not affect their independent activities. After acute intrathecal injection of various does of sinomenine, the mechanical withdraw threshold (MWT) and thermal withdraw legacy (TWL) were significantly increased as dose-dependent, reaching a peak at 2h after intrathecal administration. Continuous intrathecal administration of sinomenine can continuously alleviate pain symptoms as dose-dependent, which did not find resistant to sinomenine in rats.

The results of molecular biology experiments showed that the expressions of glutamate receptor NR1, NR2A, glutamate transporter GLT-1, GLAST, synapsin, synaptophysin, syntaxin and PSD-95 were increased after SNL operation in rats, As

well as the expression of Calpain, CDK5 and its activator protein p35/p25. After treatment with different doses of sinomenine and morphine, the above-mentioned various proteins have different degrees of reduction.

Conclusion: Our finding suggest that intrathecal administration of sinomenine has a significant dose-dependent analgesic effect for SNL-induced neuropathic pain. continuous intrathecal administration of sinomenine will not produce drug resistance. Sinomenine may play a central analgesic effect by regulating the expression of glutamate receptors and related synaptic proteins by regulating CDK5 kinase.

Key words: sinomenine; neuropathic pain; spinal dorsal horn; glutamic receptors; CDK5

目 录

中文摘要	I
Abstract	II
中英文缩略词对照表.....	VIII
第一章 前言.....	1
1.1 神经病理性疼痛.....	1
1.1.1 概述.....	1
1.1.2 神经病理性疼痛的主要动物模型.....	2
1.1.3 神经病理性疼痛的机制.....	6
1.1.4 神经病理性疼痛的治疗.....	8
1.2 青藤碱与神经病理性疼痛.....	10
1.1.1 青藤碱具有广泛的药理作用.....	10
1.1.2 青藤碱的镇痛作用与机制.....	10
1.3 本论文的研究内容和意义.....	12
第二章 鞘内注射青藤碱对神经病理性疼痛大鼠疼痛行为学的影响	13
2.1 实验材料.....	13
2.1.1 实验动物.....	13
2.1.2 实验试剂.....	13
2.1.3 实验仪器与设备.....	13
2.1.4 实验溶液配制.....	14
2.2 实验方法.....	14
2.2.1 实验动物分组与给药.....	14
2.2.2 鞘内置管.....	16
2.2.3 神经病理性疼痛模型建立.....	17
2.2.4 一般情况观察.....	18
2.2.5 机械缩足反射阈值.....	18
2.2.6 热缩足反应潜伏期.....	18

2.2.7 数据处理与统计学分析.....	19
2.3 实验结果	20
2.3.1 一般情况变化.....	20
2.3.2 单次鞘内注射青藤碱后大鼠疼痛行为学的变化.....	22
2.3.3 连续鞘内注射青藤碱后大鼠疼痛行为学的变化.....	23
2.4 本章小结	24
第三章 鞘内注射青藤碱对神经病理性疼痛大鼠脊髓背角蛋白表达的影响.....	25
3.1 实验动物与材料	25
3.3.1 实验动物.....	25
3.3.2 实验试剂与仪器.....	25
3.3.3 实验溶液配制.....	27
3.2 实验方法与步骤	28
3.2.1 动物脊髓组织总蛋白提取.....	28
3.2.2 BCA 试剂盒测浓度和蛋白变性.....	28
3.2.3 Western blot.....	29
3.2.4 数据处理与统计学分析.....	31
3.3 实验结果	31
3.4 本章小结	34
第四章 结论和展望.....	35
4.1 大鼠鞘内置管方法的比较	35
4.2 鞘内注射青藤碱后谷氨酸受体及谷氨酸转运体的表达情况	35
4.3 鞘内注射青藤碱后突触相关蛋白的表达情况	36
4.4 鞘内注射青藤碱后 CDK5 相关蛋白的表达情况	37
综述.....	39
参考文献.....	48
致 谢.....	67

Table of Contents

Abstract in Chinese	II
Abstract in English	III
Abbreviation table in Chinese and English	VIII
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Neuropathic pain.....	1
1.1.1 Overview.....	1
1.1.2 Animal model of neuropathic pain.....	2
1.1.3 Pathogenic mechanism of neuropathic pain.....	6
1.1.4 Therapy of neuropathic pain.....	8
1.2 Sinomenine and neuropathic pain.....	10
1.1.1 Pharmacological effects of sinomenine.....	10
1.1.2 Analgesic effect and mechanism of sinomenine.....	12
1.3 Contents and significance of This Thesis.....	13
Chapter2 Analgesic effects of intrathecal administration of sinomenine on neuropathic pain rats	13
2.1 Experimental materials.....	13
2.2 Experimental method.....	14
2.3 Experimental results.....	20
2.4 Summary.....	24
Chapter 3 Effects of intrathecal administration of sinomenine on protein expression of spinal dorsal horn in neuropathic pain rats	25
3.1 Experimental materials.....	25
3.2 Experimental methods.....	28
3.3 Experimental results.....	31

3.4 Summary.....	34
Chapter 4 Conclusion and prospect.....	35
4.1 Comparison of intrathecal administration methodson rats	35
4.2 Expression of glutamate receptor and transporter after intrathecal administration of sinomenine	35
4.3 Expression of synaptic - associated protein after intrathecal administration of sinomenine.....	36
4.4 Expression of CDK5 - related protein after intrathecal administration of sinomenine.....	37
Review	39
Reference.....	48
Acknowledgement.....	67

中英文缩略词对照表

英文缩写	英文全名	中文名称
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
NP	neuropathic pain	神经病理性疼痛
IASP	International Association for the Study of Pain	国际疼痛研究学会
QST	quantitative sensory testing	定量感觉测试
TN	trigeminal neuralgia	三叉神经痛
DNP	diabetic neuropathic pain	糖尿病型神经痛
PHN	postherpetic neuralgia	带状疱疹后神经痛
CCI	chronic constriction injury	坐骨神经慢性压迫模型
PSNL	partial sciatic nerve ligation	部分坐骨神经结扎模型
SNL	segmental nervous ligation	部分脊神经结扎模型
SNI	spared nerve injury	保留神经损伤模型
SNA	sciatic nerve axotomy	坐骨神经切断模型
STZ	streptozotocin	链脲佐菌素
CFA	complete freund's adjuvant	完全弗氏佐剂
DRG	dorsal root ganglia	背根神经节
SDH	spinal dorsal horn	脊髓背角
IL-1/6	interleukin-1/6	白细胞介素 1/6
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子 α
NF- κ B	nuclear factor- κ B	核转录因子- κ B
Glu	glutamic acid	谷氨酸
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartic acid	<i>N</i> -甲基- <i>D</i> -天冬氨酸
LTP	long term potentiation	长时程增强
SP	substance P	P 物质
IP ₃	inositol triphosphate	三磷酸肌醇
DG	diacylglycerol	二酰甘油
NOS	nitric oxide synthase	一氧化氮合酶
NSAIDs	nonsteroidal antiinflammatory drugs	非甾体类消炎镇痛药

COX	cyclooxygenase	环氧化酶
PG	prostaglandin	前列腺素
SCS	spinal cord stimulation	脊髓电刺激
MCS	motor cortex stimulation	运动皮层电刺激
Sin	sinomenine	青藤碱
RA	rheumatoid arthritis	类风湿性关节炎
MWT	mechanical withdraw threshold	机械缩足反射阈值
TWL	thermal withdraw legacy	热缩足反应潜伏期
ANOVA	one-way analysis of variance	单因素方差分析
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
CDK5	cyclin dependent kinase 5	细胞周期蛋白依赖性激酶 5
PSD95	postsynaptic density protein 95	突触后致密物 95

第一章 前言

疼痛 (pain) 被世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 定义为继血压、呼吸、脉搏、体温之后的“第五大生命体征”，是组织损伤或潜在损伤导致的一种不愉快却十分必要的主观感觉和情感体验^[1]。在正常生理条件下，疼痛为躯体提供收到威胁的警报信号，是一种不可缺少的生命保护功能。但在病理条件下，疼痛是大多数疾病具有的共同症状，往往与自主神经活动、运动反射、心理和情绪反应交织在一起，给患者带来痛苦。

根据疼痛的起因、部位、性质和时程，可将其分为伤害性疼痛 (nociceptive pain) 和病理性疼痛 (pathological pain)。伤害性疼痛是生理状态下，伤害性刺激直接兴奋伤害性感受器所引起的疼痛，也称为生理性疼痛。病理性疼痛可分为炎症性疼痛 (inflammatory pain)、神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 和功能性疼痛 (functional pain)，在躯体和内脏组织中均能产生，由于在病灶修复后疼痛仍可存在长达数月、数年甚至终生，也被称为慢性疼痛。慢性疼痛不仅是一种症状，也可以是一种疾病^[2]。

1.1 神经病理性疼痛

1.1.1 概述

神经病理性疼痛是临床上常见的一种慢性疼痛综合征。1994 年国际疼痛研究学会 (International Association for the Study of Pain, IASP) 将其定义为：“由神经系统原发性损害或功能障碍所诱发或引起的疼痛”，随着研究深入，2008 重新定义为：“影响躯体感觉系统的疾病或损害所直接引发的疼痛^[3]”。神经病理性疼痛可表现为阴性症状 (negative symptoms) 和阳性症状 (positive symptoms)。阴性症状可表现出令人不舒服却不产生明显痛觉的症状，包括对机械和热刺激感觉迟钝和麻木，部分机体感觉缺失，较少影响正常生活。阳性症状则以自发性疼痛 (spontaneous pain)、痛觉过敏 (hyperalgesia) 和痛觉超敏 (allodynia) 为特征^[4]。自发性疼痛表现为自发性、随机性和持久性的烧灼痛、绞痛、抽痛等异常的感觉。痛觉过敏 (又称异常性疼痛) 是由伤害性刺激引起的异常增强和延长的疼痛。痛觉超敏是指由非伤害性刺激引起的疼痛，风吹、穿衣服等轻微的刺激都

可以引起剧烈反应^[5]。临床上通常使用定量感觉测试 (quantitative sensory testing, QST) 方法对神经病理性疼痛进行评测, 作为治疗的参考标准^[6]。

多种周围或者中枢神经疾病可引起神经病理性疼痛的发生, 周围性神经病理性疼痛包括三叉神经痛 (trigeminal neuralgia, TN)、糖尿病神经病理性痛 (diabetic neuropathic pain, DNP)、带状疱疹后神经痛 (postherpetic neuralgia, PHN)、舌咽神经痛、肿瘤压迫或浸润癌性疼痛、术后或创伤后导致的神经痛和幻肢痛等。中枢性神经病理性疼痛包括脑卒中、多发性硬化、帕金森病、创伤后脊髓损伤等引起的慢性疼痛。其中, 糖尿病多发性神经病变引起的神经痛、带状疱疹后神经痛和三叉神经痛是最常见的类型^[7, 8]。神经病理性疼痛会造成患者躯体的严重不适和功能障碍, 同时伴随了睡眠障碍、抑郁、焦虑等疾病, 严重影响生活质量, 还可间接导致失业, 个人与社会关系破裂等社会问题, 为家庭和社会带来巨大的负担, 逐渐的成为一种全球负担性的慢性疾病^[9]。流行病学调查显示, 普通人群中神经病理性疼痛发病率约 6%-8%, 以中老年人居多^[10, 11], 全球约有五分之一的成年人持续经受着慢性疼痛的折磨。中国 (2011 年) 约有 1600 万罹患此病, 法国^[12] (2008 年) 约有 31.70% 人口存在慢性疼痛, 6.9% 人口存在神经病理性疼痛, 美国^[13] (2001 年) 神经病理疼痛患者约有 3 千多万人, 占总人口 1.5%。

1.1.2 神经病理性疼痛的主要动物模型

为了研究神经病理疼痛的机制和治疗方法, 从 70 年代开始, 研究人员开始建立神经病理性疼痛的实验动物模型, 大部分外周神经损伤模型是对啮齿类动物 (大鼠或小鼠) 单侧坐骨神经及其上游神经或下游分支进行处理。目前实验中常用的动物模型有坐骨神经慢性压迫模型 (chronic constriction injury, CCI)、部分坐骨神经结扎模型 (partial sciatic nerve ligation, PSNL)、部分脊神经结扎模型 (segmental nervous ligation, SNL)、保留神经损伤模型 (spared nerve injury, SNI) 等。这些动物模型均能表现出神经病理性疼痛自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏的症状, 但也存在各自特点, 具有不同之处^[10, 14]。CCI、SNL 和 SNI 是目前实验中最常用的三种慢性疼痛动物模型, 此外, 还有坐骨神经冰冻损伤 (sciatic cryoneurolysis model, SCN) 和背根神经节慢性压迫 (chronic compression of dorsal root, CC) 等模型。

1974 年, Wall 等人^[15]建立了第一个神经病理性疼痛动物模型, 即坐骨神经

切断 (sciatic nerve axotomy, SNA) 模型, 暴露大鼠坐骨神经, 用丝线结扎并切断神经干, 术后切断后的坐骨神经断端形成神经瘤 (neuroma), 引起痛觉异常, 因此也被称为神经瘤模型。该模型动物会出现术侧肢体自噬现象, 类似于人体幻肢痛的症状, 适合研究幻肢痛的机制, 但是不能完全模拟临床上神经病理性疼痛的症状。目前认为动物的自噬行为是由于后肢失去运动和感觉神经的支配, 而被动物当作异物咬掉, 与神经病理性疼痛无关^[16]。

1988 年, Bennett 和谢益宽^[17]等人为了克服 SNA 模型的缺点, 建立了坐骨神经慢性压迫 (chronic constriction injury, CCI) 模型, 将大鼠一侧坐骨神经干用 4 条尼龙线分别相距约 1mm 做轻度结扎, 直到神经外膜稍稍受压为止, 术后 5-7 天开始出现疼痛反应, 表现出自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏, 术后 10-14 天达到高峰, 可持续近 2 个月。此模型效果与神经病理性疼痛临床特征有相似之处, 且无伤肢自噬现象, 在目前的实验研究中得到广泛应用。但是轻度结扎的程度不易把握, 手术操作重复性差, 个体差异性较大。

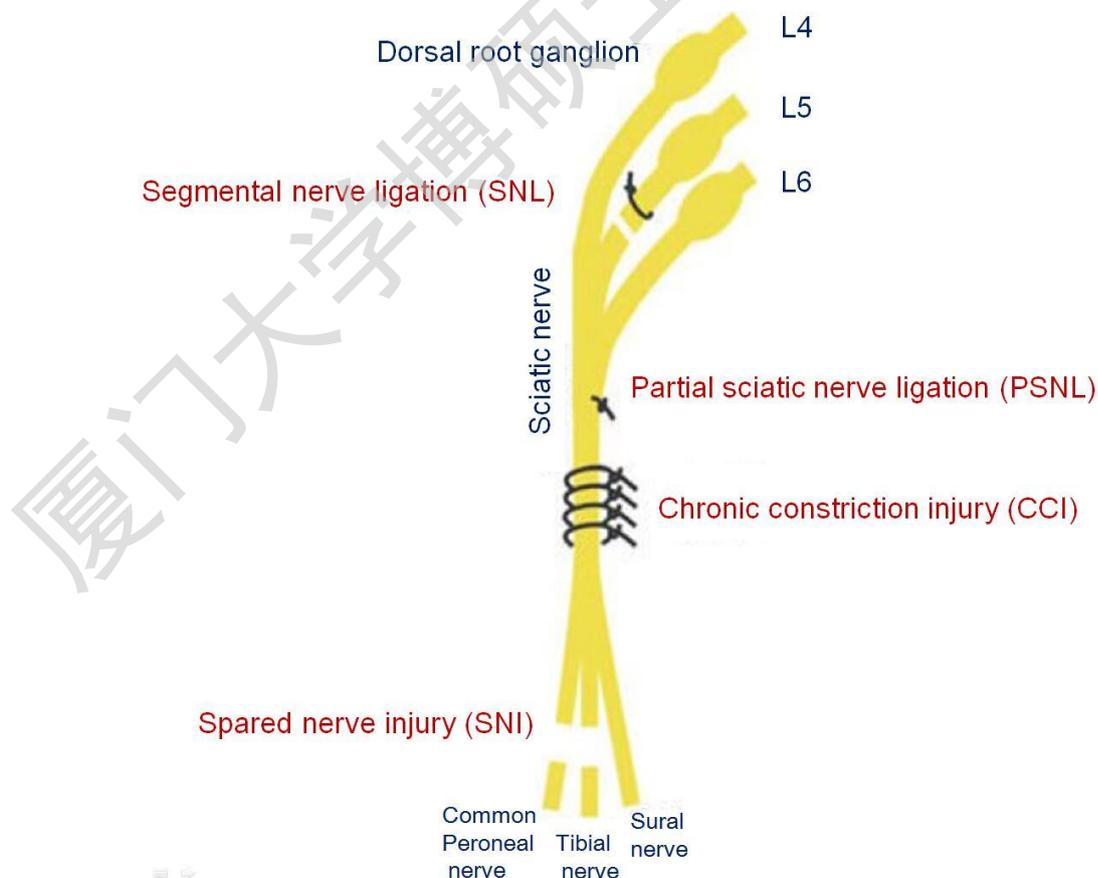


图 1.1 常见外周神经病理性痛实验动物模型^[10]

1990年, Seltzer等^[18]建立部分坐骨神经结扎 (partial sciatic nerve ligation, PSNL) 模型, 用丝线紧结扎 1/3 或 1/2 坐骨神经干。该模型与 CCI 模型相似, 能够模拟外周神经损伤后的烧灼样疼痛, 术后动物损伤侧后肢出现机械性异常痛敏和热痛敏以及抬足舔足等行为, 且无自残现象, 但不同之处在于, 术后疼痛行为一般在几小时内即可出现, 并持续数月。由于这一水平支配外周区域的神经纤维在坐骨神经中的分布是随机的, 所以部分坐骨神经结扎不会造成特定区域的感觉丧失, 且损伤纤维的数量也不能固定, 不能确定脊髓的损伤情况, 重复性和定量分析较差, 从不同动物得到的结果差异较大。

1992年, Kim 和 Chung^[19]在建立了脊神经选择结扎模型 (segmental nervous ligation, SNL)。此模型在麻醉下分别结扎 L₅ 和 L₆ 脊神经, 或者仅结扎并剪断 L₅ 脊神经。术后 12~20h 可出现机械痛觉过敏, 术后 1d 可出现热痛敏, 大约持续 5-10 周, 大鼠行为表现为步态异常, 后肢轻度外翻、足趾紧收。此模型优点在于结扎部位和结扎强度变异小, 个体差异小, 尽可能排除了实验误差, 而且手术侧和非手术侧会出现明显的脊髓损伤和非损伤的差异, 有利于比较性的研究, 但实验操作复杂, 容易发生感染, 部分大鼠术后会发生自噬现象。

2000年, Decosterd 和 Woolf 等人^[20]建立保留神经损伤 (spared nerve injury model, SNI) 模型。该模型结扎大鼠一侧坐骨神经干分支中的胫神经和腓总神经结扎, 保留腓神经。术后 1d 内大鼠出现显著的机械异常痛敏和热痛觉过敏, 14 天达高峰, 持续 7~8 月。该模型操作简单, 重复性好。

糖尿病神经病理性痛是糖尿病最常见的并发症之一, WHO 预计 2030 年全球约有 3.6 亿人罹患糖尿病, 且大多数为 II 型糖尿病, 约 50% 的患者伴随周围神经病变^[21]。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 可以通过氧化和羟基化对胰岛 B 细胞发生毒性作用而诱导糖尿病, 被广泛用于糖尿病模型制作。Courteix 和 Eschaliere 在 1994 年首先报道该模型^[22]。此外, 腹腔注射 β 细胞毒性药物四氧嘧啶 (alloxan) 也可制作糖尿病模型, 但是效果不及 STZ^[23, 24]。高脂高糖饲料喂养联合腹腔注射 35mg/kg STZ 可以建立理想的 II 型糖尿病神经性痛模型, 成功率达 80%^[25]。

福尔马林 (formalin) 和完全弗氏佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA) 是实验中常用的致炎致痛物质, 常用于制作炎性疼痛模型。皮下注射福尔马林导致

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库